

**Aktivitäten und Regulationseigenschaften
von Enzymen in der Rattenleber in
Abhängigkeit von Änderungen der Ernährung**

von
Albin Kupfer
aus
Hagenau/Poxdorf

1977 326



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548225_0015

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen - Nürnberg

Lehrstuhl II

Vorstand: Prof. Dr. K. Brand

Aktivitäten und Regulationseigenschaften von Enzymen in der Rattenleber in Abhängigkeit von Änderungen der Ernährung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Albin Kupfer
aus
Hagenau/Poxdorf

Gedruckt mit der Erlaubnis
des Fachbereiches Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent: Prof. Dr. K. Brand



Tag der mündlichen Prüfung: 27. September 1977

Inhaltsangabe

	Seite
1 Liste der Abkürzungen und Zeichen	
2 Einleitung	1
3 Methoden und Materialien	5
3.1. Versuchsbedingungen	5
3.2. Präparation der Leberhomogenate und des Analysen- materials	5
3.3. Enzymaktivitätsmessung	7
3.4. Chemische Bestimmungen	8
3.5. Reagenzien	9
3.6. Statistik	9
4 Ergebnisse	10
4.1. Aktivitäten der Pyruvatkinase, Glutamat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase im Verlauf der Tag- und Nachtperiodik	10
4.2. Untersuchungen über den Einfluß von Fasten und Wieder- auffütterung auf das Lebergewicht, die Konzentration makromolekularer Zellbestandteile und den Lipidgehalt in der Rattenleber	11
4.2.1. Lebergewicht	11
4.2.2. Glykogen	12
4.2.3. Lipide	12
4.2.4. Protein	15
4.2.5. Ribonucleinsäure	15
4.2.6. Desoxyribonucleinsäure	15
4.3. Verhalten der Aktivitäten der GDH, der PK und der LDH bei Nahrungsentzug und Wiederauffütterung	20
4.3.1. Glutamat-Dehydrogenase	20
4.3.2. Pyruvatkinase	24
4.3.3. Lactat-Dehydrogenase	25
4.4. Regulationseigenschaften der Glutamat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase bei Nahrungsentzug und Wiederauffütterung	26
4.4.1. Glutamat-Dehydrogenase	26
4.4.2. Pyruvatkinase	27
5 Diskussion	32
6 Zusammenfassung	42
7 Literaturverzeichnis	44

1 Liste der Abkürzungen und Zeichen

Substrate, Cosubstrate und Effektoren

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
c-AMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert)
PEP	Phosphoenolpyruvat
α -KG	α -Ketoglutarat
FDP	Fructose-1,6-bisphosphat
L-Ala	L-Alanin

Enzyme

PK	Pyruvatkinase (ATP: Pyruvat-Phosphotransferase, E.C. 2.7.1.40)
GDH	Glutamat-Dehydrogenase (L-Glutamat: NAD-Oxidoreduktase (desaminierend), E.C. 1.4.1.2)
LDH	Lactat-Dehydrogenase (L-Lactat: NAD-Oxidoreduktase, E.C. 1.1.1.27)
HMG-CoA-Reduktase	β -Hydroxy- β -methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (Mevalonat: NADP-Oxidoreduktase (CoA acylierend), 1.1.1.34)

Puffer

TRA-HCl-Puffer	Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer
TRA-EDTA-Puffer	Triäthanolamin-Äthylendiamintetraessigsäure-Puffer
Tris-HCl-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid-Puffer

Sonstige Abkürzungen und Zeichen

DNA	Desoxyribonucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
Prot.	Protein
LG	Leberfrischgewicht
KG	Körpergewicht (ausgebluteter Ratten)
GL (g)	Gesamtleber in Gramm
U	Units
v	Umsatzgeschwindigkeit
$v_{\max}$	maximale Umsatzgeschwindigkeit
s	Standardabweichung
W-Fütterung	Wiederauffütterung

2 EINLEITUNG

Die Koordination der zahlreichen ineinander vernetzten Reaktionen des Zellstoffwechsels bedarf einer exakten Regulation, die gewährleistet, daß nur bei Bedarf bestimmte Prozesse des Stoffwechsels ablaufen und danach wieder abgeschaltet werden können. Molekulare Einheiten der zellulären Regulationsvorgänge sind die Katalysatoren der verschiedenen katabolen und anabolen Reaktionen, die Enzyme. Dabei kann jedes einzelne Enzym eines Stoffwechselweges eine selbststeuernde Einheit sein. In der Regel hat die Natur im Laufe der Evolution jedoch jeweils nur ein oder wenige Enzyme einer Reaktionskette mit Regulationseigenschaften ausgestattet. Die Umsatzgeschwindigkeit solcher Schrittmacherenzyme bestimmt dann den Stoffumsatz des betreffenden Stoffwechselweges. Wird die Aktivität oder Konzentration eines Schrittmacherenzyms erhöht, so erhöht sich entsprechend auch die Umsatzgeschwindigkeit des gesamten Stoffwechselweges und umgekehrt kommt es zur Erniedrigung der Umsatzrate, wenn die Aktivität oder Konzentration eines Regulationsenzyms vermindert wird.

Wegen der großen Bedeutung der Regulationsenzyme für den koordinierten Ablauf des Zellstoffwechsels ist daher besonders von Interesse zu untersuchen, welche extra- und intrazellulären Bedingungen die Aktivität bzw. Konzentration dieser Enzyme beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob und inwieweit sich die Tag- und Nachtperiodik sowie Umstellungen der Ernährung auf die zelluläre Aktivität und die Regulationseigenschaft wichtiger Kontrollenzyme des Stoffwechsels der Leber auswirken.

Für die Untersuchungen wurden die Pyruvatkinase, ein Schlüsselenzym

der Glykolyse, und die Glutamat-Dehydrogenase, ein wichtiges Enzym des Aminosäurestoffwechsels ausgewählt. Ihr Verhalten gegenüber Ernährungsumstellungen wird mit der Lactat-Dehydrogenase verglichen, ein Enzym, das keine regulatorischen Eigenschaften besitzt. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl dieser Enzyme war die Tatsache, daß sie durch zahlreiche Untersuchungen in ihren molekularen Eigenschaften bereits weitgehend bekannt sind.

Die Pyruvatkinase aus Hefe wurde erstmals 1966 von B. Hess, R. Haeckel, und K. Brand (1) als allosterisches Enzym beschrieben, ein Befund, der für zahlreiche Pyruvatkinasen aus verschiedenen Zellen und Organen bestätigt werden konnte. Von der Glutamat-Dehydrogenase ist vor allem durch die Arbeiten von G. M. Tomkins et al. (2) bekannt, daß sie durch Effektoren in ihrer Aktivität auch bei Substratsättigung sehr stark beeinflußt werden kann. Effektoren sind in diesem Falle physiologisch auftretende Nucleotide, wie Adenosin-diphosphat, das als Aktivator und Guanosin-triphosphat, das als Inhibitor des Enzyms wirkt.

Die Abhängigkeit der zellulären Aktivität einiger glykolytischer und gluconeogenetischer Schrittmacherenzyme vom jeweiligen Ernährungszustand ist in der Literatur wiederholt beschrieben. So konnte G. Weber et al. (3) zeigen, daß die Aktivität der Pyruvatkinase, der Phosphofructokinase und Glucokinase in der Leberzelle durch mehrtägiges Fasten stark abnimmt, während Wiederauffütterung in Richtung einer Normalisierung der Werte führt. Ähnliche Ergebnisse berichten J. Osterman und P. J. Fritz (4) für die Pyruvatkinase aus Darmmucosa von Ratten.

Variationen der Nahrungszusammensetzung können ebenfalls einen Einfluß auf die Enzymaktivität ausüben. S. Weinhouse und Mitarbeiter (5) wiesen nach, daß die Pyruvatkinase der Rattenleber nach vorangegangenen Fasten in der Phase der Wiederauffütterung mit kohlenhydratreicher Diät eine dreifach höhere Aktivität gegenüber dem Ausgangspunkt aufwies. Bei jungen Ratten führt eine kohlenhydratreiche Diät nach den Arbeiten von P. R. Walker et al. (6) zu einer bemerkenswerten Zunahme der Aktivität der Leber-Pyruvatkinase.

Untersuchungen von O. D. Taunton et al. (7) und F. B. Stifel et al. (8) lassen deutlich eine hormonelle Steuerung der Enzymaktivität der Pyruvatkinase in der Leber erkennen. Gabe von Insulin führte innerhalb weniger Minuten zu einem Anstieg der Pyruvatkinase-Aktivität, während die gluconeogenetischen Hormone Glucagon und Adrenalin zu einer Abnahme der Aktivität führten. J. M. Wimbust und Mitarbeiter (9) konnten nach Perfusion der Leber mit Glucose und Insulin ebenfalls eine Zunahme der Pyruvatkinase-Aktivität erzielen.

Die Aktivität dieses Enzyms ist also offensichtlich stark durch hormonelle und nutritive Bedingungen beeinflussbar, ein Verhalten, das für die Schlüsselenzyme der nahrungsverwertenden Stoffwechselwege gefordert werden muß, um eine Anpassung an die jeweilige Stoffwechselsituation zu ermöglichen.

Im Gegensatz zur Pyruvatkinase fehlen bei der Glutamat-Dehydrogenase entsprechende ausführliche Untersuchungen über ihr Verhalten in Abhängigkeit vom Ernährungszustand. Eine der wenigen Arbeiten zu diesem Problem wurde von Rajalakshmi et al. (10) durchgeführt, die zeigten, daß die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase im Gehirn junger

Ratten durch niedrigen Eiweißgehalt in der Nahrung verringert wird.

Problemstellung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß äußere Bedingungen, wie Tag- und Nachtperiodik oder Änderungen der Ernährungsbedingungen, die Aktivität oder Konzentration der Regulationsenzyme Pyruvatkinase und Glutamat-Dehydrogenase in der Leber beeinflussen.

Die Regulationseigenschaften der Enzyme wurden in zwei Richtungen verfolgt: Einmal quantitativ die Regulationskapazität, d.h. die Wirkung der Effektoren bei gegebener Substratkonzentration, und zum anderen qualitativ die Regulationseigenschaften hinsichtlich der kooperativen Wechselwirkungen des Enzyms mit seinem Substrat in An- und Abwesenheit von Effektoren. Als Maß für die Kooperativität galt im Sinne von J. Monod et al. (11) der Hill-Koeffizient.

Da in der Literatur oft unterschiedliche und nicht vergleichbare Bezugssysteme für die Angabe von Enzymaktivitäten und Metabolitenkonzentrationen verwendet werden, war es ein weiterer Punkt der Arbeit durch Vergleiche mehrerer Bezugssysteme das unter den gegebenen Versuchsbedingungen geeignetste herauszufinden. Dazu wurden makromolekulare Zellbestandteile wie DNA, RNA, Proteine und Glycogen sowie verschiedene Lipid-Fraktionen unter wechselnden Ernährungszuständen bestimmt.

3 Methoden und Materialien

3.1. Versuchsbedingungen

Versuchstiere waren männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Ausgangsgewicht von 200-250g, die von der Versuchstierzuchtanstalt Gassner, Sulzfeld, bezogen wurden.

Die Ratten wurden mit Altromin-R 1324 Haltungsdiät ad libitum gefüttert. Die Haltungsdiät enthält die Nahrungsstoffe in folgender Relation: Kohlenhydrate 68,9%, Protein 25,5% und Fett 5,6%.

Fasten bedeutet völliger Nahrungsentzug. Zur Wiederauffütterung erhielten die Ratten Haltungsdiät. In allen Versuchsabschnitten stand Wasser ad libitum zur Verfügung. Während der Dauer aller Experimente waren die Tiere einem gleichmäßigen Hell-Dunkel-Zyklus unterworfen mit der Lichtphase von 6⁰⁰-18⁰⁰ und der Abdunkelung von 18⁰⁰-6⁰⁰. Die Tötungszeiten waren - wenn nicht anders angegeben - jeweils um 8⁰⁰.

3.2. Präparation der Leberhomogenate und Herstellung des

Analysenmaterials

Den durch Kopfschlag betäubten und dekapitierten Ratten wurden die Lebern entnommen und rasch in eine 0.25M Saccharoselösung von +4°C gebracht. Das Gewicht der ausgebluteten Ratten und das Lebergewicht wurden bestimmt. Die weitere Präparation der Lebern erfolgte in einer Kühlzelle bei +4°C Raumtemperatur.

Die mit einer Schere zerkleinerten Lebern wurden in 0.25M Saccharoselösung mit einem Teflon-Homogenisator nach Potter und Elvehjem homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde auf das 5-fache der Lebergewichte mit Saccharoselösung aufgefüllt und durch einen Perlonstrumpf filtriert (=Rohhomogenat). Ein Aliquot davon

wurde für die DNA Messung entnommen und sofort bei -20°C eingefroren, ein anderer Teil für die spezielle Präparation zur Bestimmung der GLDH-Aktivität aufbewahrt.

Das übrige Rohhomogenat wurde in einer Cryofuge 20-3 der Firma Heraeus Christ bei $1500\times g$ 10 Minuten lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, der Überstand dekantiert und aufgehoben. Der Niederschlag wurde in 10ml 0.25M Saccharoselösung aufgenommen, suspendiert und durch Zentrifugation gewaschen. Die Überstände aus beiden Zentrifugationen wurden vereinigt und in diesem Homogenat die Aktivität der PK und der LDH bestimmt.

Für differenziertere kinetische Untersuchungen (Aufstellung von Substratsättigungskurven mit und ohne Effektoren) wurde aus dem Homogenat durch einstündige Zentrifugation bei $105\,000\times g$ in der präparativen Ultrazentrifuge L3-50 der Firma Beckman eine Cytosolfraktion bei $+4^{\circ}\text{C}$ gewonnen, die 24 Stunden lang gegen eine Lösung bestehend aus 0.1M TRA-Puffer (pH 7.5), 0.1M MgSO_4 und 1M KCl dialysiert wurde (=Dialysat). Die Dialysierflüssigkeit wurde einmal nach 3 Stunden gewechselt.

Die spezielle Präparation zur Bestimmung der GLDH-Aktivität wurde wie folgt durchgeführt:

Das Rohhomogenat wurde mit einem Branson Sonifier 8-12 jeweils 6×20 Sekunden lang bei 70-100 Watt unter Kühlung bis zur Aufklärung beschallt. Durch diese Ultraschallbehandlung gelang es, die Aktivität der GLDH im Vergleich zu den mit Triton X 100 behandelten Proben auf das Doppelte zu steigern.

Für die Messung der makromolekularen Bestandteile der Rattenleber

(DNA, RNA, Protein) sowie der Lipide wurde der Präparationsvorgang dahingehend geändert, daß ein Leberstückchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und pulverisiert wurde.

Ein Teil der tiefgefrorenen pulverisierten Leber wurde in einer Mischung Chloroform-Methanol 2:1 (V/V) aufgenommen und damit die Lipidextraktion nach der Methode von J. Folch et al. (12) durchgeführt. Ein anderer Teil wurde zur Bestimmung des Zellgehaltes an DNA, RNA und Protein in 0.25M Saccharoselösung aufgenommen.

Für die Glykogenbestimmung wurde ein frisch entnommenes Leberstückchen sofort in heiße 30%-ige Kalilauge gebracht.

3.3 Enzymaktivitätsmessung

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte unter Standardbedingungen mit Hilfe eines registrierenden Zeiss-Spektralphotometers PM4 bei einer Wellenlänge von 340 bzw. 366nm. Eine Einheit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die 1µMol Substrat in 1 Minute umsetzt. Die Auswahl des richtigen Bezugssystems war eine Problemstellung der vorliegenden Arbeit.

Der Meßansatz zur Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität im Leberhomogenat enthielt in 1ml:

0.0435M Tris-HCl-Puffer (pH 7.7) mit 25mg% Albumin,

0.01M $MgCl_2$,

0.12mM NADH,

3mM Na-Pyruvat.

Die Aktivitätsbestimmung der Pyruvatkinase erfolgte nach einer von T. Bücher und G. Pfeleiderer (13) angegebenen Methode, die vor allem hinsichtlich der Konzentration von Phosphoenolpyruvat und ADP stark modifiziert wurde.

Der Meßansatz enthielt in 1.04ml:

0.072M TRA-HCl-Puffer (pH 7.5),

0.01M MgSO_4 ,

0.05M KCl,

0.12mM NADH,

4.81mM PEP,

4.81mM ADP,

LDH in einer Aktivität von 11 U.

Die Effektorenkonzentration im Meßansatz war 0.096mM FDP bzw.

1.92mM L-Ala.

Die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase wurde bei einer Wellenlänge von 366nm nach der von E. Schmidt (14) angegebenen geringfügig modifizierten Methode bestimmt.

Der Meßansatz enthielt in 1ml:

0.05M + 0.0025M TRA-EDTA-Puffer (pH 8),

0.1M NH_4Cl ,

0.18mM NADH,

0.01M α -Ketoglutarat.

Aktiviert wurde mit einem Zusatz von 1mM ADP, inhibiert mit

0.005mM GTP im Substratsättigungsbereich.

3.4. Chemische Bestimmungen

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der Biuret-Methode nach T.E. Weichselbaum (15) bestimmt. Als Berechnungsgrundlage diente ein Koeffizient, der aus einer Eichkurve unter Verwendung eines handelsüblichen Standardproteingemisches (Versatol oder Labtrol) erhalten wurde.

DNA wurde nach einem von Z. Dische (16) angegebenen Verfahren gegen einen Standard aus Kalbsthymus-DNA mit Diphenylreagenz gemessen.

Die RNA-Messung erfolgte nach Z. Dische (17) mit Orcin-Reagenz gegen einen RNA-Standard aus Hefe. Zur Berechnung wurde ein Korrekturfaktor herangezogen, um die Verfälschung der Meßergebnisse durch DNA zu korrigieren.

Die Gesamtlipide wurden gravimetrisch ermittelt.

Triglyceride wurden nach alkalischer Hydrolyse durch enzymatische Messung des Glycerins unter Verwendung einer Boehringer Testpackung nach M. Eggstein und F. H. Kreutz (18) bestimmt. Die Messung des Phospholipid-Phosphors erfolgte nach C. H. Fiske und Y. Subbarow (19).

Glykogen wurde nach der von C. A. Good, H. Kramer und M. Somogyi (20) beschriebenen Methode durch enzymatische Messung der Glucose bestimmt.

3.5. Reagenzien

Für alle Messungen wurden im Handel erhältliche, für biochemische Zwecke geeignete Reagenzien mit dem notwendigen Reinheitsgrad verwendet. Von der Firma Boehringer stammen: PEP, Pyruvat, ADP, NADH, GTP, LDH, FDP.

Von der Firma Merck stammen: PEP, TRA-HCl-Puffer, Tris-Puffer, TRA-EDTA-Puffer, L-Ala, MgCl, MgSO_4 , KCl, NH_4Cl , Saccharose, Kalbsthymus-DNA.

3.6. Statistik

Die Prüfung der Hypothese, ob die Meßwerte aller Zeitpunkte Verteilungen mit dem gleichen Erwartungswert (Mittelwert) entstammen, wurde durch einfache Varianzanalysen und anschließende Paarvergleiche mittels linearer Kontraste nach Scheffe durchgeführt (32). Statistisch gesichert sind Unterschiede - wenn nicht anders angegeben - bei $p < 0.01$. Dies bedeutet, daß eine Aussage mit mehr als 99%-iger Wahrscheinlichkeit zutrifft.

4 Ergebnisse

4.1. Aktivitäten der Pyruvatkinase, Glutamat-Dehydrogenase und

Lactat-Dehydrogenase im Verlauf der Tag- und Nachtperiodik

Abbildung 1 zeigt, daß die Enzyme PK, GLOH und LDH in ihrer Aktivität keinem circadianen Rhythmus folgen. Alle Enzymaktivitäten, die an mehreren Tagen jeweils im Abstand von 6 Stunden gemessen wurden, bleiben während der hellen und dunklen Phase konstant.

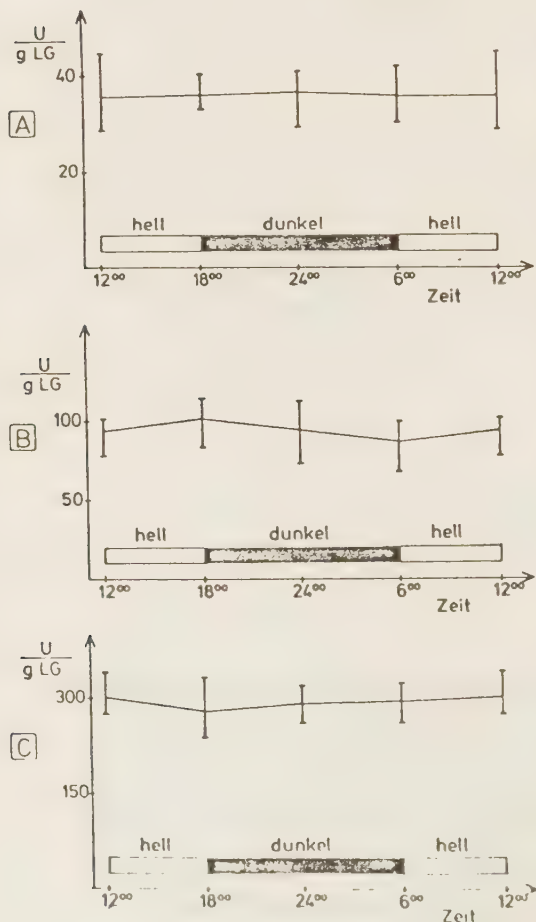


Abb. 1

Aktivitäten der Pyruvatkinase (A), Glutamat-Dehydrogenase (B) und Lactat-Dehydrogenase (C) im Verlauf von 24 Stunden. Die angegebenen Enzymaktivitäten ($\frac{U}{g LG}$) sind als Mittelwerte aus 5-13 Messungen mit den maximalen Abweichungen angegeben. Auch in den anderen Abbildungen bedeuten die von den Mittelwerten nach oben und unten aufgetragenen Striche die maximalen Abweichungen der Einzelwerte.

Die Lichtphase dauerte von 6⁰⁰-18⁰⁰, die Dunkelheit von 18⁰⁰-6⁰⁰.

4.2. Untersuchungen über den Einfluß von Fasten und Wiederauffütterung auf das Lebergewicht, die Konzentration makromolekularer Zellbestandteile und den Lipidgehalt in der Rattenleber

4.2.1. Lebergewicht

Die Lebergewichte sinken schon nach 24 Stunden Fasten vom Ausgangspunkt (ungefähr 11g) auf nahezu die Hälfte ab, bleiben etwa auf diesem Niveau während der gesamten Fastendauer von 72 Stunden und kehren nach der Wiederauffütterung rasch auf die ursprüngliche Höhe zurück. Abbildung 2 zeigt die Schwankungen der Lebergewichte während der Dauer des Versuches.

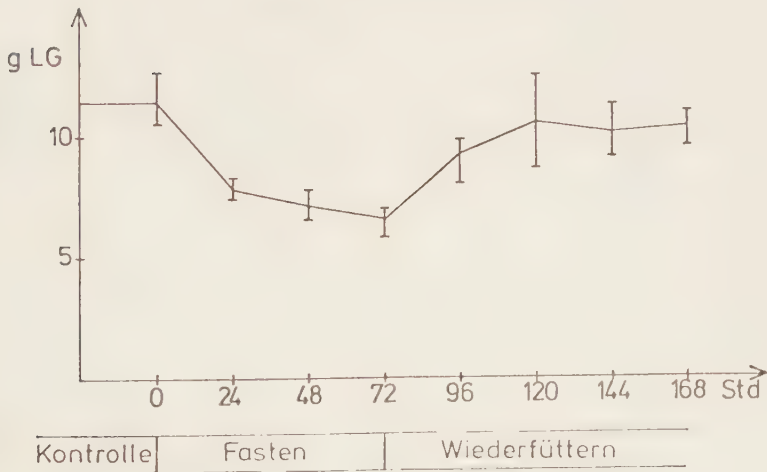


Abb. 2 Einfluß von Fasten und Wiederauffütterung auf die Lebergewichte

4.2.2. Glykogen

Das Glykogendepot der Leber wird bereits nach 24 Stunden Fasten völlig abgebaut, aber nach erneuter Nahrungsaufnahme wieder vollständig aufgefüllt und erreicht zunächst das Kontrollniveau von fast 0.8g/Gesamtleber. Im weiteren Verlauf der Wiederfütterungsphase nimmt der Glykogengehalt ab. Wie Abb. 3 zeigt, verhält sich der Glykogengehalt bei allen verwendeten Bezugssystemen gleichsinnig.

4.2.3. Lipide

Der Einfluß des Ernährungszustandes auf den Gehalt an Gesamtlipiden, Triglyceriden und Phospholipiden in der Leber wird in Abb. 4 dargestellt. Durch Fasten kommt es zu einer Abnahme des Triglyceridgehaltes um ungefähr 40%, während die Phospholipide nur um ungefähr 25% abfallen. Die Gesamtlipide sinken um etwa 30%. Mit Ausnahme der Phospholipide steigen die Lipide nach 72 Stunden Wiederauffütterung in einer überschießenden Reaktion auf das 2-fache bzw. auf mehr als das 4-fache der Fastenwerte an, um im weiteren Verlauf auf die Ausgangshöhe zurückzugehen.

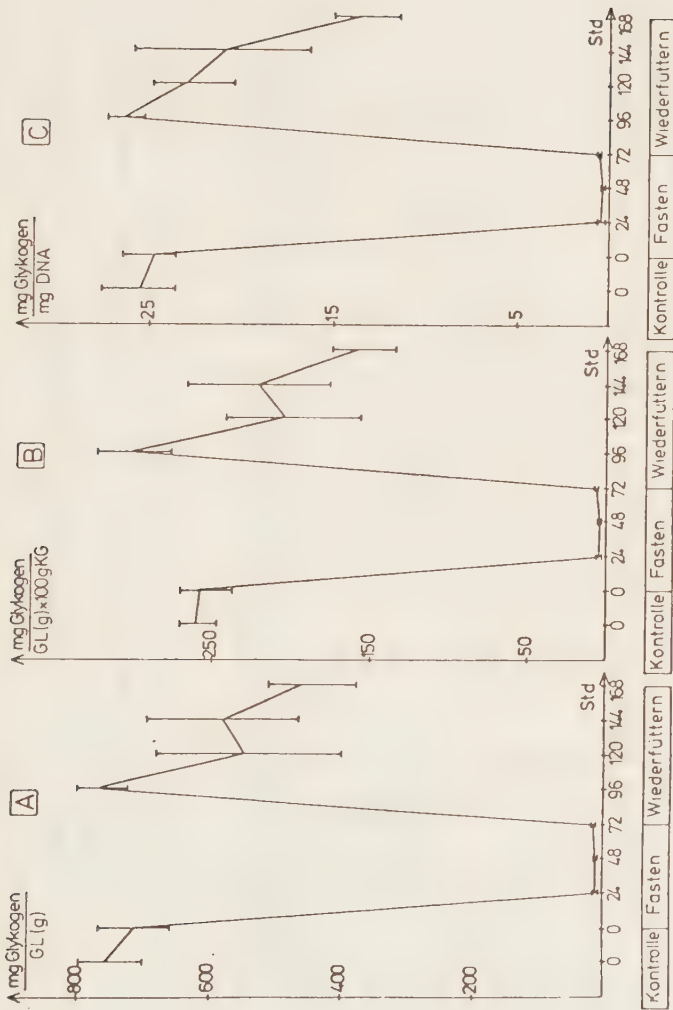


Abb. 3 Änderung des Glykogengehaltes in Rattenlebern im Verlauf einer 72-stündigen Fasten- und 96-stündigen Wiederauffütterungsperiode.
Die Mittelwerte in mg Glykogen aus 2-6 Versuchen mit ihren maximalen Streuungen sind für folgende Bezugssysteme angegeben: A Gesamtleber, B 100g Körpergewicht, C mg DNA

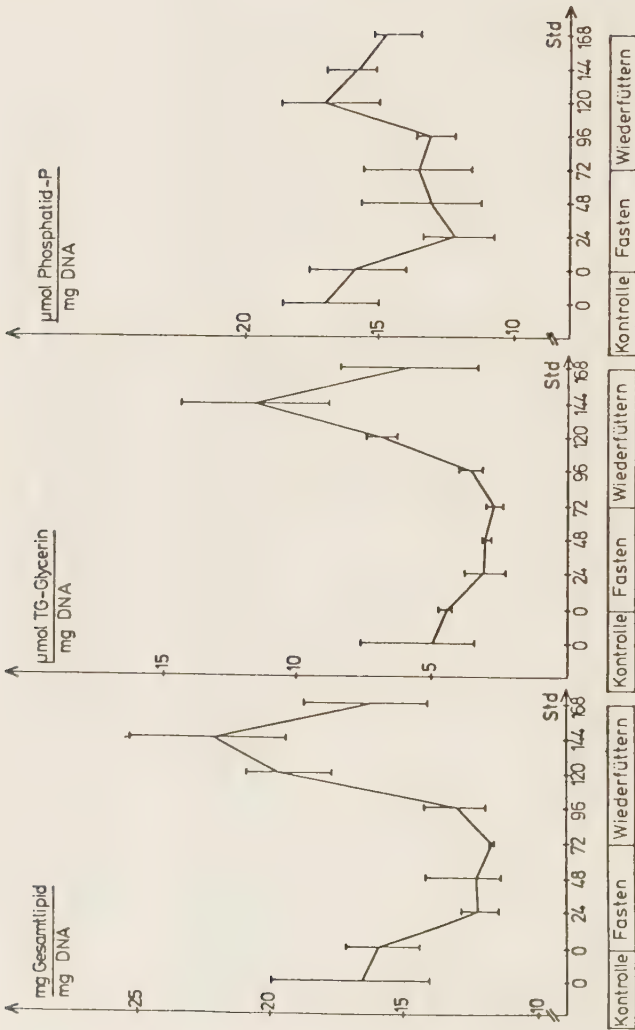


Abb. 4 Änderung des Gehaltes an Gesamtlipiden, Triglyceriden und Phospholipiden in Rattenlebern im Verlauf einer 72-stündigen Fasten- und 96-stündigen Wiederauffütterungsperiode.

Die Graphik stellt die Mittelwerte aus 2-6 Versuchen mit ihren maximalen Streuungen dar.

4.2.4. Protein

Die Schwankungen des Proteingehaltes pro DNA halten sich in relativ engen Grenzen trotz der Variation des Ernährungszustandes (Abb. 5a). Der Proteinanstieg im Fasten bezogen auf Lebergewicht ist eine Folge des Absinkens der Lebergewichte (Abb. 5a). In den weiteren Darstellungen der Abbildung 5b mit den Bezugswerten Körpergewicht und Gesamt-leber sind allerdings deutliche Reaktionen des Proteingehaltes auf die wechselnden Ernährungszustände zu erkennen, wobei der Anstieg am Ende der Wiederfütterungsphase auffällig ist.

4.2.5. Ribonucleinsäure

Der Quotient RNA/DNA als Maßstab der Proteinbiosynthese schwankte zwischen 3.2 (Kontrolle) bis 2.5 (72 Std. Fasten) und erreichte seinen Gipfel von 3.8 nach 48 Stunden Wiederauffütterung. Anschließend stellte sich das normale Verhältnis RNA und DNA wieder ein. Aus der Abbildung 6 ist ein ernährungsabhängiges Verhalten des Kurvenverlaufs der RNA nicht eindeutig zu erkennen.

4.2.6. Desoxyribonucleinsäure

Der mittlere DNA-Gehalt der Rattenleber beträgt unter den angegebenen Versuchsbedingungen 28,9mg. Die DNA zeigt von allen untersuchten Bezugssystemen das konstanteste Verhalten und die größte Unabhängigkeit von Variationen des Ernährungszustandes (Abb. 7). Auftretende Schwankungen während des Versuchsablaufes halten sich in engen Grenzen. Die Veränderungen des DNA-Gehaltes bezogen auf das Lebergewicht sind verursacht durch die Variationen der Lebergewichte hervorgerufen durch die Änderung des Ernährungszustandes. Damit erfüllt die DNA am besten die Anforderungen an ein geeignetes Bezugssystem: konstantes Verhalten und gute Meßbarkeit.

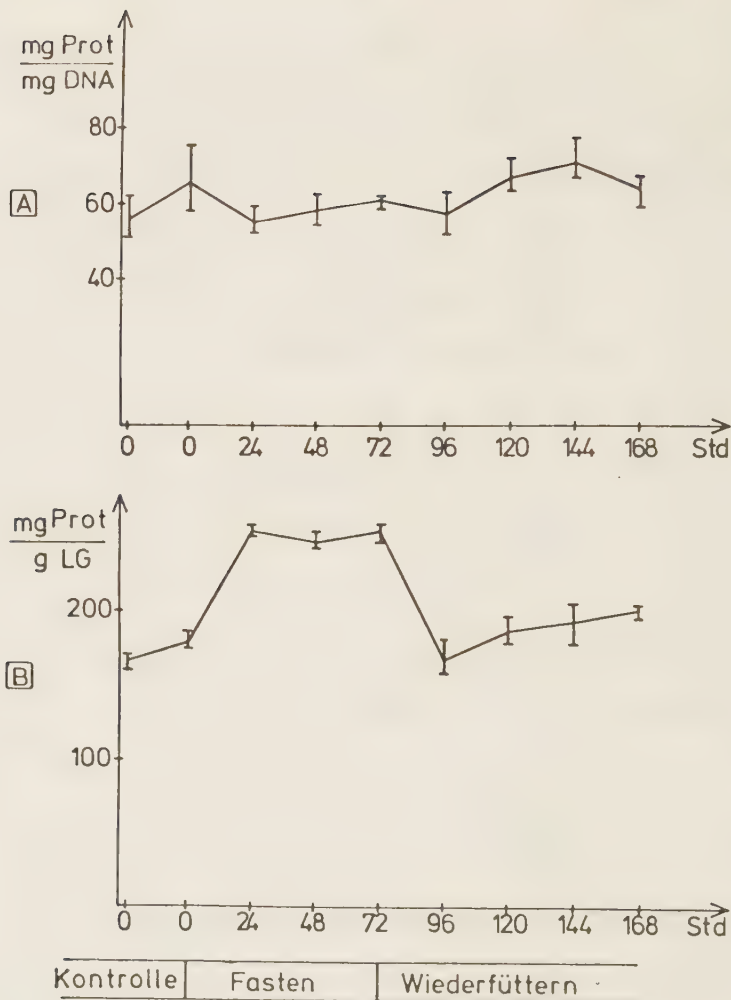


Abb. 5a Änderung des Proteingehaltes in Rattenlebern im Verlauf einer 72-stündigen Fasten- und 96-stündigen Wiederauffütterungsperiode.

In der Graphik sind die Mittelwerte in mg Protein aus 2-6 Versuchen mit ihren maximalen Streuungen für die Bezugssysteme mg DNA (A) bzw. Gramm Lebergewicht (B) angegeben.

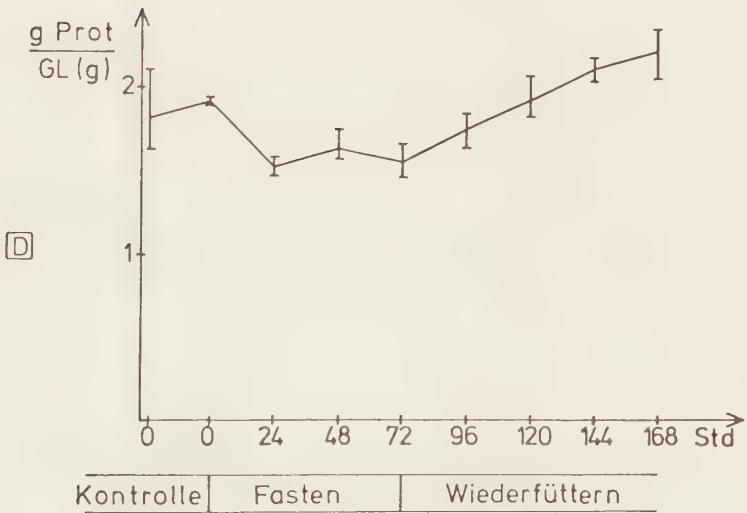
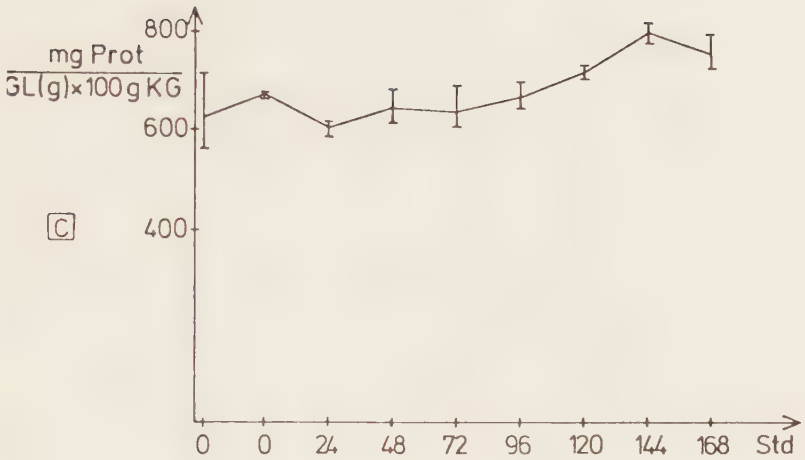


Abb. 5b Änderung des Proteingehaltes in Rattenlebern im Verlauf einer 72-stündigen Fasten- und 96-stündigen Wiederauffütterungsperiode.

In den Graphiken sind die Mittelwerte aus 2-6 Versuchen mit ihren maximalen Abweichungen für die Bezugssysteme 100g Körpergewicht (C) und Gesamtleber (D) aufgetragen.

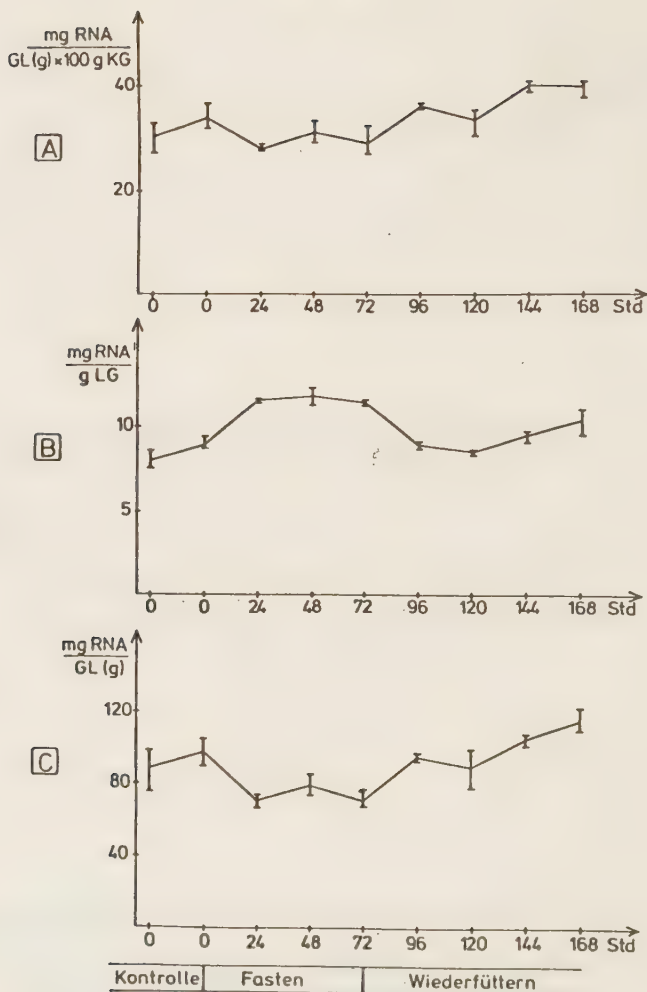


Abb. 6 Der Gehalt an Ribonucleinsäure in Rattenlebern im Verlauf einer 72-stündigen Fasten- und 96-stündigen Wiederauffütterungsperiode.

Die Mittelwerte in mg RNA aus 2-6 Versuchen sind für die Bezugssysteme A 100g Körpergewicht, 8 Gramm Lebergewicht und C Gesamtleber graphisch dargestellt.



Abb. 7 Gehalt an Desoxyribonucleinsäure in Rattenlebern im Verlauf einer 72-stündigen Fasten- und 96-stündigen Wiederauffütterungsperiode.

Die Mittelwerte in mg DNA aus 2-6 Versuchen sind für die Bezugssysteme A Gesamtleber, B Gramm Lebergewicht und C 100g Körpergewicht graphisch dargestellt.

4.3. Verhalten der Aktivitäten der Glutamat-Dehydrogenase, der Pyruvatkinase und Lactat-Dehydrogenase bei Nahrungsentzug und Wiederauffütterung

4.3.1. Glutamat-Dehydrogenase

Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, ist die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase nach 48 Std. Fasten gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht ($p < 0,01$). Mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95% ($p < 0,05$) kommt es auch zu einer Erhöhung der Aktivität nach 48 Std. im Vergleich zur Aktivität nach 24 Std. Fasten.

Die Abbildungen 8a und 8b zeigen in einer Zusammenfassung die GLOH in Relation zu verschiedenen Bezugssystemen. In allen Abbildungen ist zu erkennen, daß die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase nach 48 Std. Fasten über den Ausgangswert angestiegen ist, um nach Wiederauffütterung schon innerhalb von 24 Std. annähernd auf den Ausgangswert zurückzukehren. Daraus ist zu erkennen, daß durch Nahrungsentzug die Enzymsynthese induziert wird. An diesen vier Graphiken soll außerdem die Problematik der Wahl des Bezugssystems bei der Angabe von Enzymaktivitäten dargelegt werden. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ändert sich das Lebergewicht erheblich (Abb. 2), wodurch eine zu starke Erhöhung der Enzymaktivität während des Fastens bei den Werten vorgetäuscht wird, die auf g Lebergewicht bezogen sind. In diesem Fall kommt es während des Fastens durch Wasserverlust und Glykogenabbau (Abb. 3) zu einer relativen Konzentrierung der zellulären Enzyme. Auch der Proteingehalt der Leber (Abb. 5a, 5b) unterliegt Schwankungen unter den experimentellen Bedingungen und ist daher als Bezugssystem

nicht verwendbar.

Wie aus dieser Gegenüberstellung hervorgeht, sind zur Angabe der Enzymaktivität geeignete Bezugssysteme, welche die absolute Änderung der Enzymkonzentration wiedergeben, der DNA-Gehalt, der unter den Versuchsbedingungen konstant bleibt (Abb.7) und die gesamte Leber. Bei der Verwendung dieser Bezugssysteme ist der Anstieg der Glutarat-Dehydrogenase-Aktivität nach 48 Std. Fasten nur noch geringfügig, jedoch statistisch signifikant (Tab. 1).

Tabelle 1 GLOH-Aktivität bei Nahrungsentzug und Wiederauffütterung

Versuchsbedingungen		<u>GLOH-Aktivität</u> mg DNA	p-Wert im Vergleich zur Kontrolle	p-Wert im Vergleich zu 24 Std. Fasten
Kontrolle		43 $\pm$ 5,7		
Fasten	24 Std.	44 $\pm$ 9		
	48 Std.	65 $\pm$ 13	p < 0,01	p < 0,05
	72 Std.	47 $\pm$ 6,2		
Wiederfütterung	96 Std.	40 $\pm$ 4,2		

Die Angaben sind Mittelwerte $\pm$ s aus 4-8 Ratten.

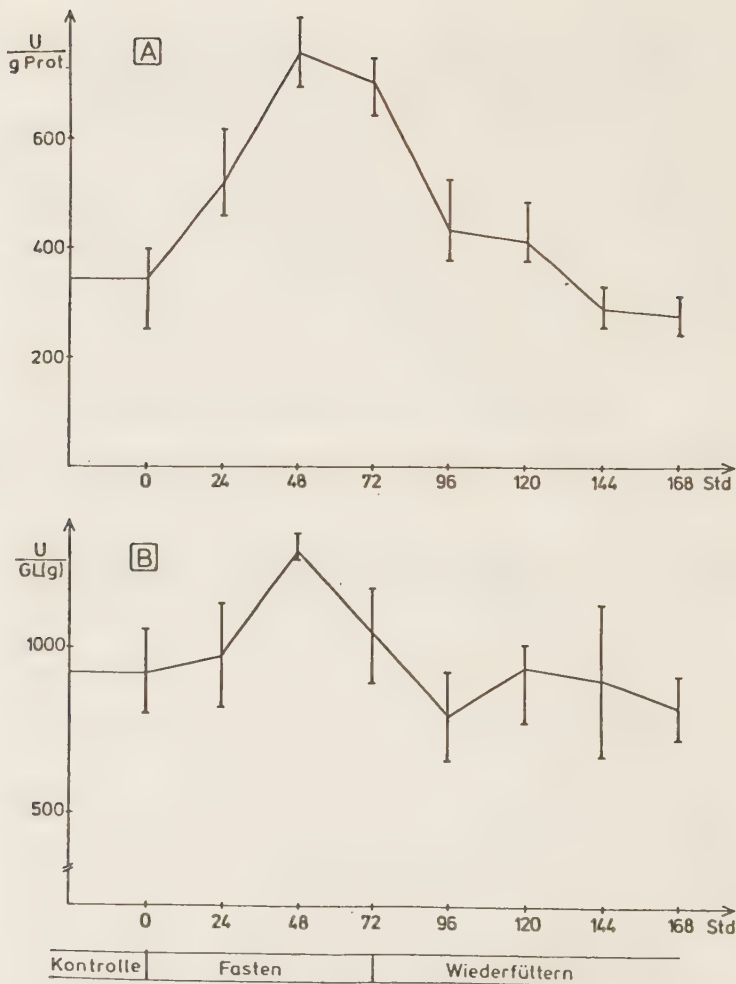


Abb. 8a GLDH-Aktivität unter Verwendung verschiedener Bezugssysteme bei Nahrungsentzug und Wiederauffütterung

Aufgetragen sind die Mittelwerte $\pm$ s aus 4-8 Ratten für den Bezugswert g Protein (A) und Leber (B).

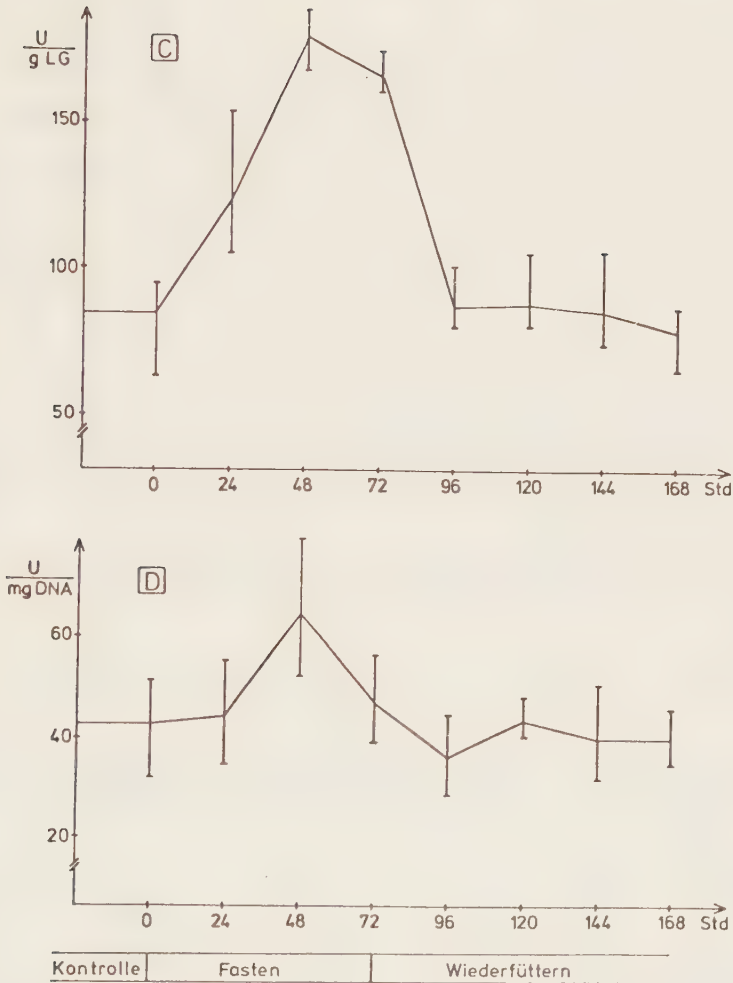


Abb. 8b G6PDH-Aktivität unter Verwendung verschiedener Bezugssysteme bei Nahrungsentzug und Wiederauffütterung.

Aufgetragen sind die Mittelwerte $\pm$ s aus 4-8 Ratten für die Bezugswerte g Lebergewicht (C) und mg DNA (D).

4.3.2. Pyruvatkinase

In Abbildung 9 und Tabelle 2 ist das Verhalten der Pyruvatkinase-Aktivität bei quantitativer Änderung der Ernährung dargestellt. Wie daraus zu ersehen ist, sinkt nach 24 Std. Fasten die Aktivität auf die Hälfte, nach 48 Std. Fasten auf ein Drittel und erreicht nach 72 Std. Fasten ein Viertel des Ausgangswertes. Die zu den angegebenen Zeitpunkten gemessenen Aktivitäten sind gegenüber der Kontrollgruppe signifikant niedriger ($p < 0,01$). Ebenso signifikant unterscheidet sich der Wert nach 72 Fastenstunden von der Aktivität nach 24 Fastenstunden. Die Aussage über statistisch signifikante Unterschiede ist in diesen Fällen nur mit Einschränkung erlaubt, da die Variationsanalyse keine Gleichheit der Varianzen ergibt.

Nach Beginn der Wiederauffütterung steigt die Pyruvatkinase-Aktivität wieder an und erreicht nach 96 Std. Wiederauffütterung den Ausgangswert.

Tabelle 2 PK-Aktivität bei Nahrungsentzug und Wiederauffütterung

Versuchs- bedingungen		PK-Aktivität mg DNA	p-Wert im Vergleich zur Kontrolle	p-Wert im Vergleich zu 24 Std. Fasten
Kontrolle		25 $\pm$ 3,4		
Fasten	24 Std.	13 $\pm$ 2	$p < 0,01$	
	48 Std.	8,7 $\pm$ 0,7	$p < 0,01$	$p < 0,05$
	72 Std.	6 $\pm$ 0,4	$p < 0,01$	$p < 0,01$
Wieder- fütterung	96 Std.	24 $\pm$ 4,5		

Die Angaben sind Mittelwerte $\pm$ s aus 4-8 Versuchen.

Die Ungleichheit der Varianzen in diesem Fall schränkt die Aussagekraft der statistischen Signifikanz ein.

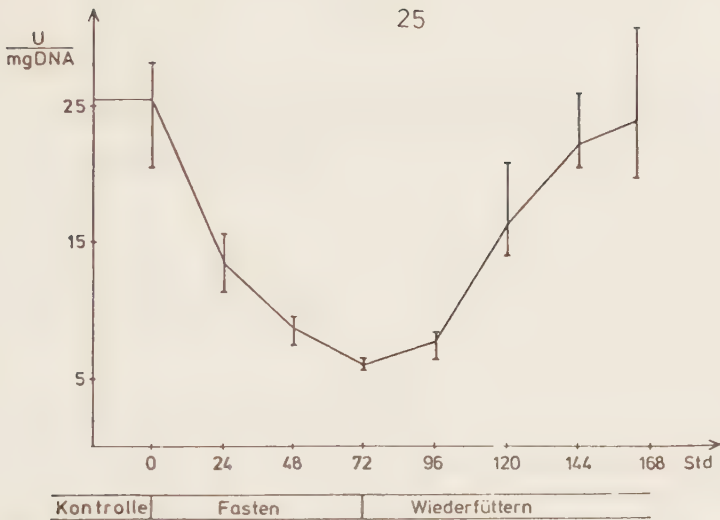


Abb. 9 Pyruvatkinase-Aktivität bezogen auf DNA bei Nahrungsentzug und Wiederauffütterung

Die Mittelwerte $\pm$ s aus 4-8 Versuchen sind mit ihren maximalen Streuungen aufgetragen.

4.3.3. Lactat-Dehydrogenase

Die Tabelle 3 zeigt, daß 72-stündiges Fasten zu einer Abnahme der LDH-Aktivität führt, die aber verglichen mit dem Schlüsselenzym Pyruvatkinase geringfügiger ist. Nahrungszufuhr bringt die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase in der Leber nach 48 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurück.

Tabelle 3 LDH-Aktivität bei Nahrungsentzug und Wiederauffütterung

Versuchsbedingungen		LDH-Aktivität mg DNA	Aktivität in %
Kontrolle		164 $\pm$ 13	100
Fasten	72 Std.	105 $\pm$ 12	64
Wieder- fütterung	48 Std.	156 $\pm$ 13	95

Die Angaben sind Mittelwerte $\pm$ s aus 4-8 Ratten.

4.4. Regulationseigenschaften der Glutamat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase bei Nahrungsentzug und Wiederauffütterung

4.4.1. Glutamat-Dehydrogenase

Die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase ist durch Effektoren in erheblichem Maße beeinflussbar; ADP wirkt als Aktivator, GTP ist ein starker Inhibitor.

Die Tabelle 4 zeigt, daß eine 1mM ADP-Konzentration die Enzymaktivität unter allen Versuchsbedingungen um das Dreifache erhöht, während in Anwesenheit von 0.005mM GTP das Enzym praktisch vollständig gehemmt wird. Die Effektorwirkung wird demnach durch Änderungen des Ernährungszustandes nicht beeinflusst.

Tabelle 4 Wirkung der Effektoren ADP und GTP auf die Aktivität der GIDH in Rattenlebern nach Fasten und Wiederauffütterung

Versuchsbedingungen	Aktivierung (%) durch 1mM ADP	Inhibierung (%) durch 0.005mM GTP
Kontrolle	299 $\pm$ 17	98 $\pm$ 0,9
Fasten 72 Std.	287 $\pm$ 22	96 $\pm$ 3,5
Wieder- fütterung 96 Std.	308 $\pm$ 20	98 $\pm$ 0,9

Die Angaben sind Mittelwerte $\pm$ s aus jeweils 10-15 Versuchen. Alle Messungen erfolgten im Substratsättigungsbereich. Die Berechnung der prozentualen Aktivierung ist wie folgt: $\frac{\text{GIDH Aktivität + Effektor}}{\text{GIDH Aktivität - Effektor}} \times 100$
Zur Berechnung der Inhibierung wird analog verfahren. Dabei erhält man zunächst die Restaktivität in %, die von 100% abgezogen die Inhibierung in % ergibt.

4.4.2. Pyruvatkinase

Zur Untersuchung der Regulationseigenschaften der Pyruvatkinase wurden die Substratsättigungskurven in An- und Abwesenheit der Effektoren L-Alanin und Fructose-1,6-bisphosphat gemessen (31). In den Graphiken 10a-c ist der Kurvenverlauf der Aktivität der Pyruvatkinase aus Rattenlebern nach Nahrungsentzug (Abb. 10b) und Wiederauffütterung (Abb. 10c) im Vergleich zur Normalfütterung (Abb. 10a) abgebildet. Die Kurven ohne Effektor und die Kurven mit dem Inhibitor L-Alanin folgen einer sigmoidalen Form, die Kurven mit Fructose-1,6-bisphosphat als Aktivator zeigen einen hyperbolen Verlauf. Deutlich ist eine Verminderung der Pyruvatkinase-Aktivität mit und ohne Effektoren nach 72-stündigem Fasten zu sehen, der Kurvenverlauf selbst bleibt weitgehendst uneinflusst.

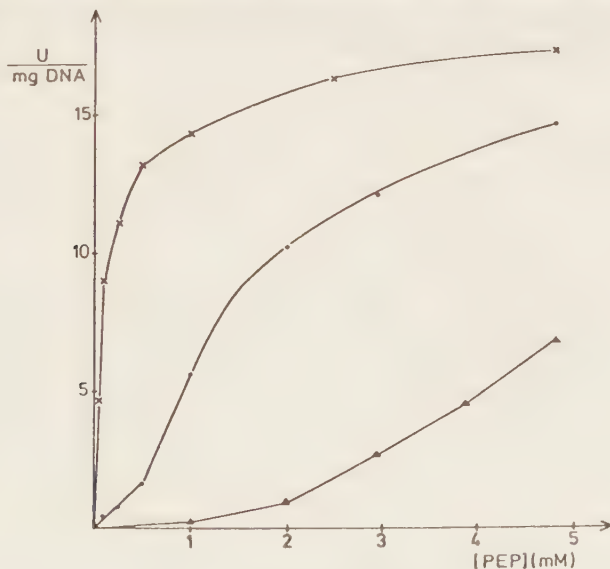
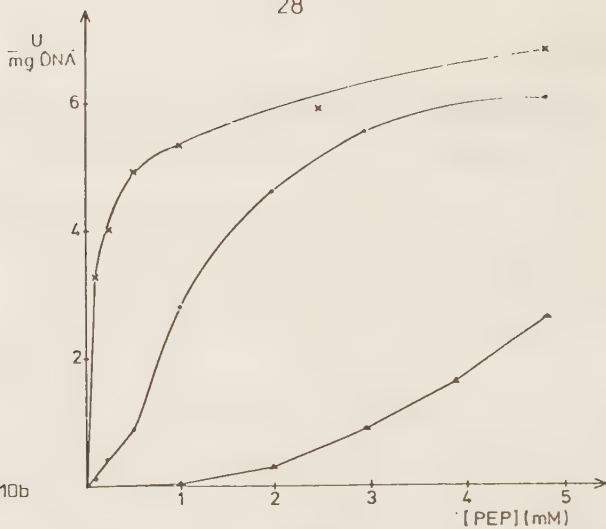
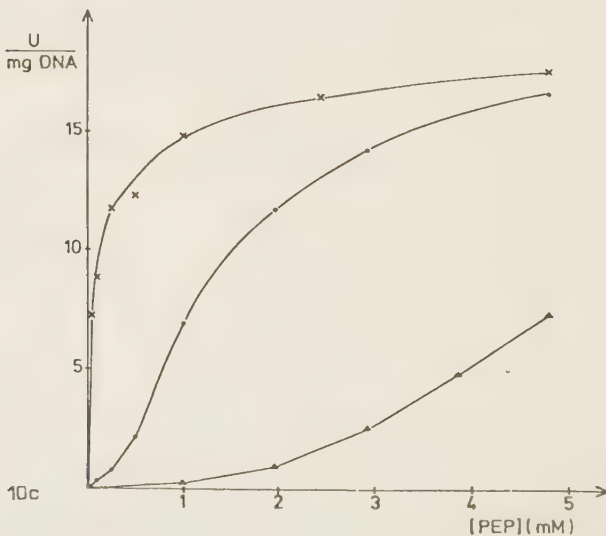


Abb. 10a Kinetisches Verhalten der Pyruvatkinase bei Normalfütterung mit Haltungsdiät.

Kurven ohne Effektor (—•—•—•—), mit Aktivator FDP 0.096 mM (—x—x—x—), mit Inhibitor L-Alanin 1.92 mM (—△—△—△—).



Kinetisches Verhalten der Pyruvatkinase nach 72 Std. Nahrungsentzug ,
 ohne Effektor (—•—•—), mit Aktivator FDP 0.096 mM (—x—x—x—),
 mit Inhibitor L-Alanin 1.92 mM (—Δ—Δ—Δ—).



Kinetisches Verhalten der Pyruvatkinase nach 96 Std. Wiederauffütterung
 ohne Effektor (—•—•—), mit Aktivator FDP 0.096 mM (—x—x—x—),
 mit Inhibitor L-Alanin 1.92 mM (—Δ—Δ—Δ—).

Aus den Michaelis-Menten-Kurven wurden bei einer Substratkonzentration von 0.5mM PEP die prozentuale Aktivierung und bei einer Konzentration von 1.98mM PEP die prozentuale Inhibierung berechnet und in der Tabelle 5 aufgeführt. Dabei ergeben sich hinsichtlich des Ausmaßes der Inhibierung in den verschiedenen Ernährungszuständen keine Veränderungen. Die Aktivierungskapazität der Pyruvatkinase dagegen scheint bei dieser Auswertung im Fastenzustand etwas verringert zu sein, was statistisch jedoch nicht gesichert wurde.

Tabelle 5 Der Einfluß von FDP und L-Ala auf die Aktivität der Pyruvatkinase bei Normalfütterung, Fasten und Wiederauffütterung

Versuchsbedingungen	PK-Aktivierung (%) durch 0.096mM FDP	PK-Inhibierung (%) durch 1.92mM L-Ala
Kontrolle	863 $\pm$ 276	91 $\pm$ 2
Fasten 72 Std.	495 $\pm$ 121	90 $\pm$ 3
Wieder- fütterung 96 Std.	654 $\pm$ 96	92 $\pm$ 2

Die Mittelwerte $\pm$ s wurden aus je 6-9 Versuchen gewonnen.

Die Messung der Aktivierungskapazität erfolgte bei einer Substratkonzentration von 0.5mM PEP, das Ausmaß der Inhibierung wurde bei einer Substratkonzentration von 1.98mM PEP ermittelt. Zur Berechnung der prozentualen Aktivierung und Inhibierung siehe Legende von Tabelle 4.

Die logarithmische Umformung der Substratsättigungskurven der PK im Sinne der Hill-Gleichung ist in den Abbildungen 12 A, 12 B und 12 C für die verschiedenen Ernährungszustände wiedergegeben. Die Hill-Gleichung lautet: $\log \frac{v}{v_{\max} - v} = n \log S - \log K$ (21). Die Steigung der Geraden entspricht dem Hill-Koeffizienten n , der ein Maß für die Kooperativität eines allosterischen Enzyms darstellt (11). Dieser wurde graphisch und rechnerisch bestimmt. In Tabelle 5 sind die errechneten Hill-Koeffizienten und $K_{0.5}$ (PEP)-Werte der Pyruvatkinase für Normalfütterung, Fasten und Wiederauffütterung aufgeführt. Die unter diesen Versuchsbedingungen gemessenen vergleichbaren Hill-Koeffizienten und $K_{0.5}$ -Werte für PEP unterscheiden sich nicht oder nur geringfügig bei den jeweiligen Ernährungszuständen, woraus geschlossen werden kann, daß diese Parameter für die Regulationseigenschaften der Pyruvatkinase durch Fasten und Wiederauffütterung nicht beeinflußt werden.

Tabelle 6 Vergleich der Hill-Koeffizienten und $K_{0.5}$ (PEP)-Werte der PK bei Normalfütterung, Fasten und Wiederauffütterung in An- und Abwesenheit von Effektoren

		Hill-Koeffizient (n)	$K_{0.5}$ (PEP) in mMol
ohne Effektor	Normalfütterung	1.5	1.8
	Fasten 72 Std.	1.5	1.4
	W-Fütterung 96 Std.	1.9	1.2
mit L-Ala	Normalfütterung	2.4	6.2
	Fasten 72 Std.	2.4	6.3
	W-Fütterung 96 Std.	2.4	6
mit FDP	Normalfütterung	0.97	0.1
	Fasten 72 Std.	0.94	0.138
	W-Fütterung 96 Std.	0.92	0.079

Die errechneten Werte sind gemittelt aus einer Population von 3-9 Ratten.

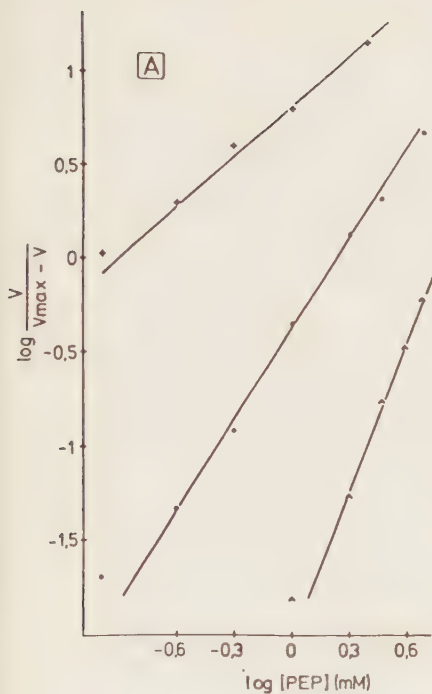
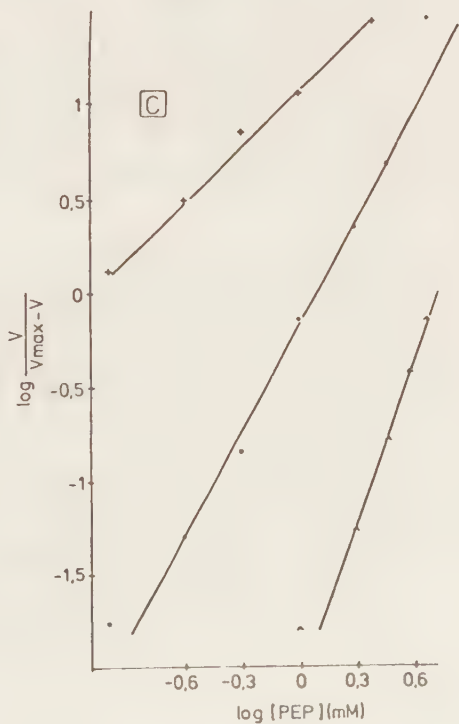
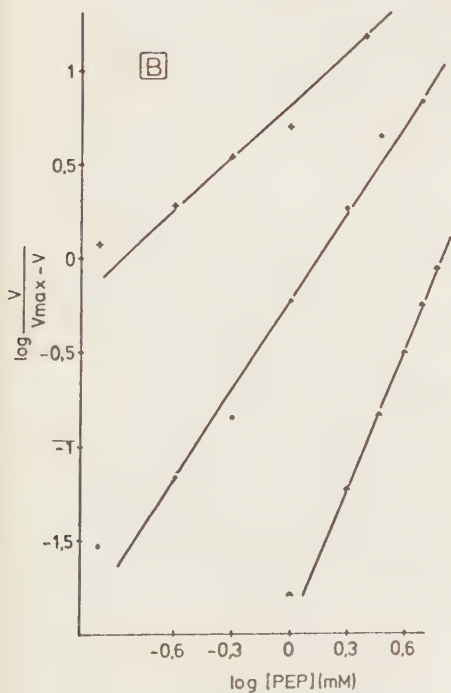


Abb. 12 Graphische Darstellung der Hill-Koeffizienten der PK für Kurven mit und ohne Effektoren

A Kontrolle, B 72 Std. Fasten, C 96 Std. Wiederauffütterung.

Kurven ohne Effektoren (—●—●—),
mit 0.096mM FDP (—×—×—),
mit 1.92mM L-Ala (—→—→—).



5 Diskussion

Die Enzyme als Regulationsmoleküle des Zellstoffwechsels sind selbst wieder Produkte biochemischer Reaktionen; sie unterliegen daher ebenfalls Steuerungsvorgängen hinsichtlich Synthese, Abbau, Aktivierung und Inaktivierung. So weiß man aus zahlreichen Untersuchungen, daß Enzymaktivitäten abhängig und beeinflussbar sind von Faktoren wie Ernährung, Hormonwirkung, Konzentration bestimmter Metabolite, z.T. zeigen sich auch Tag- und Nachtschwankungen. Auf wichtige Untersuchungen zu diesem Thema wurde bereits einleitend hingewiesen (3-10).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage untersucht werden, ob durch Änderungen der Ernährungsbedingungen, die sich erfahrungsgemäß auf die Enzymaktivitäten auswirken, auch Regulationseigenschaften von Enzymen beeinflußt werden oder ob die Regulationseigenschaften der Enzyme unter allen Umständen unverändert erhalten bleiben. Weiterhin sollte im Rahmen dieser Untersuchungen ein geeignetes Bezugssystem für die Angabe von Enzymaktivitäten im Gewebe bei Ernährungsversuchen ausgewählt werden und geprüft werden, ob die in dieser Studie zu messenden Enzyme einem Tages- und Nachtrhythmus unterliegen.

Labortiere zeigen hinsichtlich des Zeitpunktes der Nahrungsaufnahme häufig spezieeseigentliche Verhaltensweisen. Insbesondere von Ratten ist bekannt, daß sie vor allem Futterzeiten in der Dunkelperiode bzw. um Mitternacht bevorzugen. Insofern bestehen zwischen der Nahrungsaufnahme und Tag- und Nachtperiodik enge Beziehungen, die z.B. auch zu rhythmischen Schwankungen bestimmter Enzymaktivitäten führen. Beispiele dafür sind die HMG-CoA-Reduktase, das Schrittmacherenzym der Cholesterinbiosynthese, welches einen Aktivitätsgipfel um Mitternacht erreicht (22). V.R. Potter und T. Ono (23) berichten von geringen Änderungen der

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase im Verlauf von Tag und Nacht bei ad libitum gefütterten Ratten. P.R. Walker und Mitarbeiter (6) fanden rhythmische Änderungen der Tyrosinaminotransferase-Aktivität junger Ratten, die kurz nach ihrer Entwöhnung einer kontrollierten Fütterung mit einer Lichtregie gegensinnig zum natürlichen Tag- und Nachtablauf ausgesetzt waren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Pyruvatkinase, die Glutamat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase auf tagesperiodische Aktivitätsänderungen untersucht. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 1. Alle untersuchten Enzyme zeigen ein konstantes, von der Lichtregie unabhängiges Aktivitätsverhalten. Die Ergebnisse der Pyruvatkinase stimmen überein mit Beobachtungen von P.R. Walker et al. (6) und R.J. Bonney et al. (24), die sogar trotz strenger Fütterungszeiten und Lichtregie keine bemerkenswerte Änderung der Pyruvatkinase-Aktivität im Tagesablauf feststellen konnten. Von der Glutamat-Dehydrogenase und der Lactat-Dehydrogenase sind keine vergleichbaren Untersuchungen bekannt. Obwohl die zur Untersuchung gelangten Enzyme keine circadianen Aktivitätsschwankungen zeigten, erfolgte die Tötung der Tiere und die Präparation der Homogenate für die Ernährungsversuche konstant um 8⁰⁰ morgens.

Für die Auswahl eines geeigneten Bezugssystems war es von praktischer Bedeutung, das Verhalten der Konzentrationen wichtiger Zellbestandteile während des Fastens und nach anschließender Wiederauffütterung zu untersuchen. Dadurch konnten auch zusätzliche Informationen über die jeweilige Stoffwechselsituation der Tiere erhalten werden, was eine bessere Beurteilung des Ernährungszustandes ermöglicht. Da sich bei den gewählten Versuchsbedingungen, Fasten und Wiederauffütterung, zahlreiche Stoffe in ihrer Konzentration erheblich ändern, ist es nicht möglich, die Enzymaktivitäten darauf zu beziehen. Nur solche Stoffe sind als Bezugssystem

geeignet, die sich bei den gewählten Versuchsbedingungen nicht ändern.

Der Einfluß von Änderungen der Ernährung auf die Lipide ist in der Abbildung 4 dargestellt. Die Konzentration der Triglyceride in der Leber verminderte sich während des Fastens stärker als die der Phospholipide. Auch die Reaktion auf die Wiederauffütterung ist bei beiden unterschiedlich. Während die Phospholipide auf etwa den Ausgangswert zurückgehen, zeigen die Triglyceride eine zunächst starke überschießende Reaktion bevor sie schließlich die Höhe des Ausgangsniveaus wieder erreichen. Dies entspricht auch ihren unterschiedlichen Funktionen. Die Triglyceride als Energiespeicher nehmen im Fasten stärker ab, da die Zellen durch oxidativen Abbau der Fettsäuren ihren Energiebedarf decken. Die Phospholipide dagegen sind wichtige Bestandteile der Zellmembran, deren Struktur und Funktion von Änderungen der Ernährung weitgehendst unbeeinflußt bleiben müssen.

Das Verhalten des Glykogens in Abhängigkeit von der Ernährung ist wiederholt untersucht worden (6, 23, 24). In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, daß das Glykogendepot der Leber ein schnell mobilisierbarer Energiespeicher ist, der innerhalb von 24 Std. Fasten praktisch völlig entleert wird, während umgekehrt die Wiederauffütterung eine ebenso rasche Auffüllung des Glykogenspeichers in der Leber mit sich bringt (Abb. 3). Die im weiteren Verlauf der Wiederauffütterung beobachtete Abnahme des Glykogens stimmt überein mit Befunden von V.R. Potter und T. Ono (23), die allerdings eine Diät aus 30% Protein und 61% Kohlenhydraten verwendeten. Der Glykogengehalt der Leber wird nicht nur durch Umstellungen der Ernährung verändert, sondern ist auch vom Tages-Nacht-Rhythmus abhängig. Fütterung ad libitum oder die Einhaltung vorgeschriebener Futterpläne kombiniert mit einer Hell-Dunkel-Lichtregie

beeinflusst dementsprechend den Glykogengehalt der Leber, wobei eine Zunahme in der Dunkelheit und eine Abnahme bei Tageslicht erfolgt. Dies bleibt nicht ohne Einfluß auf das Lebergewicht (24), was bei der Verwendung des Lebergewichtes als Bezugswert beachtet werden muß.

Der Proteingehalt der Leber wurde - wie beschrieben - aus dem Rohhomogenat gemessen. Die Änderungen des Proteingehaltes im Fasten und Wiederauffüttern blieben in Grenzen (Abb, 5a, 5b). Nach geringem Abfall im Fasten kommt es nach Wiederauffütterung zu einem Anstieg des Proteingehaltes auf etwas über die Höhe des Ausgangswertes. Die Änderung des Proteingehaltes in Fasten und Wiederauffütterung könnte zumindest teilweise eine Folge der Zunahme der proteolytischen Aktivität sein. Nach S. Pontremoli et al. (25) steigt im Fasten die Zahl der Leber-Lysosomen verbunden mit einer Erhöhung der totalen und freien, d.h. nicht strukturgebundenen, proteolytischen Aktivität. Es mag dahingestellt bleiben, ob das Erscheinen freier proteolytischer Aktivitäten im Fasten in vivo stattfindet oder artefizieller Natur ist. Aber der Anstieg der totalen proteolytischen Aktivität muß kritisch beurteilt werden, da die fastenbedingte Abnahme der Lebergewichte, die hier als Bezugssystem Verwendung findet, zu einer rechnerischen Erhöhung des Quotienten proteolytische Aktivität/g Leber führt.

Der RNA-Gehalt in der Leber zeigt ständige Veränderungen, die nur schwer ein ernährungssynchrones Verhalten erkennen lassen (Abb. 6). Dagegen bleibt der DNA-Gehalt in der Leber während des Fastens und der Wiederauffütterung von allen untersuchten Makromolekülen am konstantesten. Seine Unabhängigkeit von Ernährungseinflüssen ist in der Graphik 7 dargestellt. Somit erfüllt die DNA die wesentlichen Voraussetzungen und Anforderungen, die an ein Bezugssystem gestellt werden müssen. Der Nachweis eines geeigneten Bezugssystems für die Angabe von Enzymaktivitäten

im Lebergewebe bei Ernährungsversuchen war ein Teilaspekt dieser Arbeit, da in der einschlägigen Literatur sehr unterschiedliche Bezugssysteme herangezogen werden. Dies macht in den meisten Fällen einen Vergleich von Ergebnissen, die nicht unter genau denselben Bedingungen erzielt und auf dasselbe System bezogen werden, unmöglich, insbesondere dann, wenn sich die Größenordnung des Bezugssystems bei den verschiedenen Versuchsbedingungen ändert.

Am Beispiel der Aktivität der GLOH im Verlauf von Fasten und Wiederauffütterung soll dies dokumentiert werden. Betrachtet man die Abbildung 8b mit dem Bezugswert Lebergewicht, so fällt der starke Anstieg der GLOH-Aktivität im Fasten auf, der am zweiten Tage seinen Höhepunkt erreicht und nach einer geringen Abnahme am dritten Fastentag rasch auf den ursprünglichen Wert während der Wiederauffütterung absinkt. Im Vergleich dazu wird die GLOH-Aktivitätsänderung bezogen auf den DNA-Gehalt der Leber stark relativiert (Abb. 8b). Zwar ist auch hier nach zwei Tagen Fasten ein signifikanter Unterschied zum Kontrollwert zu finden (Tab. 1), aber der Aktivitätsanstieg ist verzögert und das Ausmaß der Änderung der Aktivität wesentlich geringer. Am dritten Fastentag ist dann wieder die Aktivität unverändert zum Kontrollwert. Somit wird durch ein inkonstantes, aber häufig verwendetes Bezugssystem, z.B. g Lebergewicht, zumindest bei ernährungsabhängigen Versuchen die Enzymaktivität falsch wiedergegeben.

Die starke Abhängigkeit des Lebergewichtes von der Ernährung (Abb. 2) wiederum ist im wesentlichen eine Folge der starken Schwankungen des Glykogengehaltes der Leber sowie des an Glykogen gebundenen Wassers (26, 27, 28). Auch die Änderungen des Lipid- und Proteingehaltes in der Leber beeinflussen das Lebergewicht bei Fasten und Wiederauffütterung. Der Bezugswert Protein ist wegen der Änderung des Proteingehaltes, verur-

sacht möglicherweise durch Zunahme der proteolytischen Aktivität, nicht brauchbar.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung des Einflusses von Ernährungsumstellungen auf die Regulationseigenschaften von Enzymen wurden auch die Änderung der jeweiligen Enzymaktivitäten verfolgt.

Die Abhängigkeit der Lactat-Dehydrogenase vom Fasten und Wiederauffütterung ist in der Tabelle 3 wiedergegeben. Die LDH-Aktivität sinkt nach 3 Tagen Fasten um etwa ein Drittel und erreicht nach zwei Tagen Wiederauffütterung wieder ihr Anfangsniveau.

Die Abhängigkeit der Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase von proteinreicher Ernährung wurde bereits gezeigt (10). Bei der Untersuchung, welchen Einfluß Fasten und Wiederauffütterung auf die GLOH-Aktivität nehmen, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und dem Anstieg der Aktivität nach 2 Tagen Fasten auch bei Verwendung unterschiedlicher Bezugssysteme (Abb. 8a, 8b und Tab.1). Die Diskrepanz des Ausmaßes der Enzymaktivitätsänderungen bei Bezugnahme auf verschiedene Systeme wurde bereits diskutiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Aktivität der GLOH im Fasten zunächst zunimmt, im weiteren Verlauf von Fasten und Wiederauffütterung rasch wieder auf die Höhe des Ausgangswertes zurückgeht. Inwieweit dabei die Induktion der Enzymsynthese mit proteolytischen Aktivitäten interferiert, bleibt offen. Neuere Untersuchungsergebnisse (29) zeigen eher einen Abfall der mit ADP maximal stimulierten GLOH-Aktivität am dritten Fastentag.

Die Pyruvatkinase-Aktivität ging während des Fastens bis auf etwa ein Viertel des Ausgangsaktivität zurück und erreichte nach vier Tagen Wiederauffütterung den Kontrollwert. Dies steht auch in Übereinstimmung mit Ergebnissen von J. Osterman und P.J. Fritz (4) für die Pyruvatkinase aus

Darmmucosa von Ratten oder von G. Weber et al. (3), die eine Aktivitätsabnahme der Leber-Pyruvatkinase nach mehrtägigem Fasten nachweisen konnten.

Wegen der besonderen Bedeutung der Pyruvatkinase bei der Regulation der Glykolyse (1) wurde der Einfluß von Ernährungsumstellungen auf die Regulationseigenschaften besonders an diesem Enzym untersucht. Anhaltspunkte für Aussagen über die Regulationseigenschaften von Enzymen ergeben die Messungen von Substratsättigungskurven und ihre Umrechnung mit Hilfe der Hill-Gleichung (21) in eine Gerade mit der Steigung n . Nach J. Monod et al. (11) ist n ein Koeffizient, der das Ausmaß der Wechselwirkungen beschreibt, die zwischen den Untereinheiten eines allosterischen Enzyms durch die Bindung gleichartiger Liganden (=homotrope Wechselwirkung) oder verschiedenartiger Liganden (=heterotrope Wechselwirkung) erfolgen. Der Hill-Koeffizient n ist somit eine Funktion der Kooperativität der Enzymuntereinheiten. Er nimmt mit steigender Kooperativität zu. Die Regulationseigenschaften eines Enzyms beruhen im wesentlichen auf diesen kooperativen Wechselwirkungen durch die Einflußnahme homotroper und heterotroper Liganden. Änderungen des Hill-Koeffizienten als Ausdruck veränderter Kooperativität bedeuten eine Änderung der Regulationseigenschaften eines Enzyms.

Die Messung des Hill-Koeffizienten wurde bei der Untersuchung der Regulationseigenschaften der Pyruvatkinase herangezogen, um Aufschluß über das regulatorische Verhalten dieses wichtigen Enzyms des Kohlenhydratstoffwechsels während Fasten und Wiederauffütterung zu bekommen. Betrachtet man zunächst die Substratsättigungskurven (Abb. 10a-c), so läßt sich keine Änderung der Wechselwirkung zwischen der Pyruvatkinase und seinem Substrat Phosphoenolpyruvat durch Ernährungsumstellung erkennen. Dies gilt auch beim Vergleich der Kurven mit den Effektoren FDP und L-Ala. Die Kurven ohne Effektoren verlaufen alle in der gleichen Weise

sigmoidal, ebenso wie die Kurven mit dem Aktivator FDP ihre hyperbole Form beibehalten. Auch der Kurvenverlauf des mit Alanin inhibierten Enzyms zeigt sich vom dreitägigen Fasten und der anschließenden Wiederauffütterung unberührt.

Dieses Resultat wird von den Hill-Koeffizienten (Tab. 6) bestätigt, die innerhalb der vergleichbaren Kurven praktisch gleich bleiben. Die Differenz von 0,4 zwischen dem 72 Std. Fastenwert von 1,5 und dem Wert 1,9 bei 96 Std. Wiederauffütterung innerhalb der Kurven ohne Effektor ist zu gering, um daraus eine signifikante Änderung der Regulationseigenschaften herleiten zu können. Auch die $K_{0.5}$ (PEP)-Werte sind durch Fasten und Wiederauffütterung kaum verändert worden. Dies bestätigt ebenfalls die Konstanz der Regulationseigenschaft der Pyruvatkinase.

E.A. Kohl und G.L. Cottam (30) dagegen berichten eine Änderung sowohl der Hill-Koeffizienten als auch der $K_{0.5}$ (PEP)-Werte der Pyruvatkinase, wenn Ratten mit einer kohlenhydratreichen und proteinarmen Diät gefüttert werden im Vergleich zu Ratten, die mit Standardkost ernährt werden. Durch die Diät änderte sich in der zitierten Untersuchung der Hill-Koeffizient n von 2,5 auf 1, während der $K_{0.5}$ (PEP)-Wert von ursprünglich 5-10 mM auf 0,3 mM abnahm, was praktisch dem Übergang einer sigmoidalen Substratsättigungskurve in eine Michaelis-Menten-Kinetik mit hyperbolem Kurvenverlauf gleichkommt. Dies bedeutet eine Abnahme der Kooperativität und somit eine Änderung der Regulationseigenschaft. Die Diskrepanz der erwähnten Untersuchung zur vorliegenden Arbeit in der Höhe des Ausgangswertes von n und $K_{0.5}$ (PEP) dürfte eine Folge des unterschiedlichen Reinheitsgrades der verwendeten Proben sein. Bei Messungen aus relativ rohen Extrakten ist der Hill-Koeffizient niedriger, vermutlich wegen des höheren Anteils des M-Typs der Pyruvatkinase. Der scheinbare Widerspruch zur vorliegenden Studie hinsichtlich der Änderung von n und $K_{0.5}$ (PEP) und somit der Regulationseigenschaft durch Diät gegenüber der Konstanz

dieser Werte bei Standardkost, Fasten und Wiederauffütterung könnte in der Verschiedenheit der Versuchsbedingungen begründet sein.

Eine weitere Möglichkeit, die Frage der Konstanterhaltung oder Änderung der Regulationseigenschaft eines Enzyms zu klären, bietet der Vergleich der Regulationskapazität, d.h. das Ausmaß der prozentualen Aktivierung und Inhibierung, durch eine konstante Effektorkonzentration, unter den hier gewählten Bedingungen Fasten und Wiederauffütterung. Wie die Tabelle 5 zeigt, sind Unterschiede in der prozentualen Aktivierung der Pyruvatkinase zu finden, die sich jedoch nicht statistisch sichern lassen. Die Höhe der Inhibierung der Pyruvatkinase durch Alanin in einer Dosis etwas über der physiologischen Konzentration (31) beim Meßpunkt von 2 mMol PEP bleibt im Fasten und nach Wiederauffütterung jeweils unverändert bei etwa 90%.

Diese Methode, die Regulationskapazität eines Enzyms als Kriterium einer Regulationseigenschaft heranzuziehen, wurde auch bei der Untersuchung der Glutamat-Dehydrogenase angewendet. Die Glutamat-Dehydrogenase ist in den Mitochondrien lokalisiert; sie spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Aminosäuren, im NH_3 -Stoffwechsel und bei der Harnstoffbiosynthese. Nach den vorliegenden Untersuchungen war sowohl nach 3 Tagen Fasten als auch nach 4 Tagen Wiederauffütterung die Regulationskapazität der Glutamat-Dehydrogenase von dieser Ernährungsumstellung unbeeinflusst. An allen Versuchstagen ist die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase in Anwesenheit von ADP etwa dreifach höher als die in Abwesenheit des Effektors ADP gemessene GDH-Aktivität, während die Hemmung des Enzyms mit GTP jeweils nahezu vollständig ist (Tab. 4).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Regulations-eigenschaften der Enzyme Pyruvatkinase und Glutamat-Dehydrogenase durch

die Ernährungsbedingungen Fasten und Wiederauffütterung nicht beeinflußt werden.

Als wichtigstes Ergebnis der Untersuchungen läßt sich zusammenfassen, daß sich die Enzymaktivitäten und damit die Enzymkonzentrationen der Pyruvatkinase und Glutamat-Dehydrogenase unter den gegebenen Ernährungsbedingungen veränderten, während die kinetischen und regulatorischen Eigenschaften beider Enzyme weitgehendst unbeeinflußt blieben.

Daraus ist abzuleiten, daß die im Rahmen von Fasten und Wiederauffütterung beobachteten Änderungen der Enzymaktivitäten auf Veränderungen der Enzymkonzentrationen beruhen, bedingt durch unterschiedliche Synthese- oder Abbaurate. Zu einer Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels im Sinne kurzfristiger regulatorischer Steuerungen der Enzymaktivität scheint es unter den hier gegebenen diätetischen Bedingungen nicht zu kommen.

Als geeignetes Bezugssystem zur Angabe von Enzymaktivitäten im Lebergewebe bei Ernährungsversuchen hat sich der DNA-Gehalt erwiesen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen über den Einfluß von Fasten und Wiederauffütterung auf die Aktivität und Regulationseigenschaften der Enzyme Pyruvatkinase, Glutamat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase in der Rattenleber durchgeführt. Zur genaueren Definition des jeweiligen Ernährungszustandes wurden die Konzentrationen an Protein, Glykogen und Lipiden, sowie der DNA-, RNA-Gehalt, das Leber- und Körpergewicht bestimmt. Die Messung dieser Größen erlaubt zugleich Aussagen über die Qualität des Bezugssystems für Enzymaktivitäten, welches als konstant gefordert werden muß. Da die Nahrungsaufnahme der als Versuchstiere verwendeten Ratten hauptsächlich um Mitternacht erfolgt, wurde wegen dieser engen Korrelation von Nahrungsaufnahme und Tag- und Nachtperiodik auch der Verlauf der Enzymaktivitäten über 24 Stunden verfolgt. Die vorgelegte Studie kommt dabei zu folgenden Ergebnissen:

1. Bei ernährungsphysiologischen Untersuchungen sind Lebergewicht oder Protein wegen ernährungsbedingter Schwankungen als Bezugssysteme für Enzymaktivitäten ungeeignet. Am besten erfüllen der DNA-Gehalt oder die gesamte Leber die Voraussetzungen, die an ein Bezugssystem gestellt werden müssen.
2. Die Aktivitäten der Pyruvatkinase, der Glutamat-Dehydrogenase und der Lactat-Dehydrogenase weisen keinen circadianen Rhythmus auf.
3. Während Fasten und Wiederauffütterung zeigen die Pyruvatkinase und Lactat-Dehydrogenase auf der einen Seite und die Glutamat-Dehydrogenase auf der anderen Seite ein gegensätzliches Verhalten. Die Aktivitäten der Pyruvatkinase und Lactat-Dehydrogenase gehen im Fasten z. T. drastisch zurück, während die Glutamat-Dehydrogenase-

Aktivität nach 48 Stunden Fasten ansteigt. In der Wiederauffütterungsphase werden von allen drei Enzymen die ursprünglichen Werte nach kurzer Zeit wieder erreicht.

4. Die untersuchten kinetischen Parameter und regulatorischen Eigenschaften von Pyruvatkinase und Glutamat-Dehydrogenase werden durch Fasten und Wiederauffütterung nicht beeinflusst. Der Verlauf der Substratsättigungskurven mit und ohne Effektor, die jeweils miteinander vergleichbaren Hill-Koeffizienten sowie die $K_{0.5}$ (PEP)-Werte der Pyruvatkinase waren unter den gegebenen Bedingungen nicht nennenswert verändert. Das Ausmaß der Aktivierung und Inhibierung der Pyruvatkinase und Glutamat-Dehydrogenase war in Fasten und Wiederauffütterung praktisch gleich, abgesehen von der etwas reduzierten Aktivierungskapazität der Pyruvatkinase im Fastenzustand.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit den Daten anderer Autoren verglichen und hinsichtlich ihrer Bedeutung für die enzymatische Regulation des Zellstoffwechsels diskutiert.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Hess, B., Haeckel, R. und Brand, K. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 824-831.
- 2 Tomkins, G.M., Yielding, K.L., Curran, J.F., Summers, M.R. und Bitensky, M.W. (1965) J. Biol. Chem. 240, 3793-3798.
- 3 Weber, G., Singhal, R.L., Stamm, N.B., Lea, M.A. und Fisher, E.A. (1966) Advan. Enzyme Regul. 5, 59-78.
- 4 Osterman, J. und Fritz, P.J. (1974) Biochemistry 13, 1731-1736.
- 5 Farina, F.A., Shatton, J.B., Morris, H.P. und Weinhouse, S. (1974) Cancer Res. 34, 1439-1446.
- 6 Walker, P.R., Bonney, R.J. und Potter, V.R. (1974) Biochem. J. 140, 523-529.
- 7 Taunton, D.D., Stifel, F.B., Greene, G.L. und Herman, R.H. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7228-7239.
- 8 Stifel, F.B., Taunton, D.D., Greene, H.L. und Herman, R.H. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7240-7244.
- 9 Winhurst, J.M., Manchester, K.L. und Harris, E.J. (1974) Biochim. Biophys. Acta 372, 72-84.
- 10 Rajalakshmi, R., Parameswaran, M. und Ramakrishnan, C.V. (1974) J. Neurochem. 23, 123-127.
- 11 Monod, J., Changeux, J.P. und Jacob, F. (1963) J. Biol. Chem. 6, 306-329.
Monod, J., Wyman, J. und Changeux, J.P. (1965) J. Mol. Biol. 12, 88-118.
- 12 Folch, J., Lees, M. und Sloane Stanley, G.H. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497-509.
- 13 Bücher, T. und Pfleiderer, G. (1955) Methods Enzymol. 1, 435-440.
- 14 Schmidt, E. (1970) in: Methoden der enzymatischen Analyse (Herausgeber: Bergmeyer, H.U.) 2. Auflage 1, 607-613, Verlag Chemie Weinheim/Bergstr.
- 15 Weichselbaum, T.E. (1946) Amer. J. Clin. Path. (Techn. Sec.) 10, 40.

- 16 Dische, Z. (1955) in: The nucleic acids (Herausgeber: Chargaff E. und Davidson J.N.) 1, 287-290, Academic Press, New York.
- 17 Dische, Z. (1955) in: The nucleic acids (Herausgeber: Chargaff E. und Davidson J.N.) 1, 301, Academic Press, New York.
- 18 Eggstein, M. und Kreutz, F.H. (1966) Klin. Wschr. 44, 262-267.
- 19 Fiske, C.H. und Subbarow, Y. (1925) J. Biol. Chem. 66, 375-400.
- 20 Good, C.A., Kramer, H. und Somogyi, M. (1933) J. Biol. Chem. 100, 485-491.
- 21 Hill, A.V. (1910) J. Physiol. 40, iv-vii.
- 22 Edwards, P.A. und Gould, R.G. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2891-2896.
- 23 Potter, V.R. und Ono, T. (1961) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 355-362.
- 24 Bonney, R.J., Hopkins, H.A., Walker, P.R. und Potter, V.R. (1973) Biochem. J. 136, 115-124.
- 25 Pontremoli, S., Melloni, E., Salamino, F., Franzini, A.T., De Flora, A. und Horecker, B.L. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3674-3678.
- 26 Hopkins, H.A., Bonney, R.J., Walker, P.R., Yager, J.D., Jr. und Potter, V.R. (1973) Advan. Enzyme Regul. 11, 169-191.
- 27 Leveille, G.A. und Chakrabarty, K. (1967) J. Nutr. 93, 546-554.
- 28 Hannappel, E. und Brand, K. (1976) persönliche Mitteilung.
- 29 Weigand, W. und Brand, K. (1976) persönliche Mitteilung.
- 30 Kohl, E.A. und Cottam, G.L. (1975) Fed. Proc. 34, 618.
- 31 Seubert, W. und Schoner, W. (1971) in: Current Topics in Cellular Regulation (Herausgeber: Horecker, B.L. und Stadtman, E.R.) 3, 237-267, Academic Press, New York.
- 32 Guenther, W.C. (1964) Analysis of Variance, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Herrn Prof. Dr. K. Brand danke ich für die Überlassung des Themas und die Förderung dieser Arbeit durch Anregung und Kritik.

Für die freundliche Unterstützung und Anleitung sei allen Mitarbeitern des Instituts Dank. Besonders hervorheben möchte ich die technische Hilfe, die ich durch Frau Kränzlein-Ernst, Frl. Ostermann, Frau Rikowski und Frau Wintzheimer erfahren habe.

Herrn Dipl. Chem. Hannappel verdanke ich praktische Hinweise.

Dr. Gunselmann vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation gilt mein Dank für die Betreuung bei der statistischen Auswertung.

Lebenslauf

Am 21. Februar 1950 wurde ich als Sohn des Bäckermeisters Hans Kupfer und seiner Frau Rosa, geb. Reck, in Hagenau/Poxdorf geboren.

Von 1956-1961 besuchte ich die Volksschule in Effeltrich und anschließend das Kaiser-Heinrich-Gymnasium in Bamberg, wo ich im Sommer 1970 das Abitur ablegte. Vom Juli 1970 bis März 1971 leistete ich den Wehrdienst. Im Sommersemester 1971 begann ich das Studium der Medizin in Erlangen. 1972 legte ich dort das Vorphysikum und im Frühjahr 1973 das Physikum ab. Im klinischen Studienabschnitt studierte ich in Wien, München und Erlangen. 1974 wurde ich als Stipendiat in die 'Studienstiftung des deutschen Volkes' aufgenommen. Im Sommer 1977 schloß ich das Studium der Medizin in Erlangen mit dem Staatsexamen ab.

Während des klinischen Studienabschnittes entstand unter der Anleitung von Prof. Dr. K. Brand am Institut für Physiologische Chemie II der Universität Erlangen-Nürnberg die vorliegende Arbeit.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990